

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

---

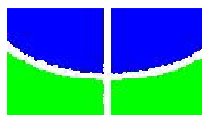
**KARINA AZEVEDO LIMA**

**DESCRIÇÃO DAS PRINCIPAIS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO  
LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS DA UNIVERSIDADE  
DE BRASÍLIA – LAMAL – UnB**

**Monografia apresentada para a conclusão do  
Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de  
Agronomia e Medicina Veterinária da  
Universidade de Brasília**

Brasília - DF

2014



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

---

KARINA AZEVEDO LIMA

DESCRIÇÃO DAS PRINCIPAIS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO LABORATÓRIO  
DE MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA –  
LAMAL – UnB

Monografia apresentada para a conclusão do Curso  
de Medicina Veterinária da Faculdade de  
Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade  
de Brasília

Orientador

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ângela Patrícia Santana

Brasília - DF

2014

## Ficha Catalográfica

Lima, Karina Azevedo.

Descrição das principais atividades desenvolvidas no laboratório de microbiologia de alimentos da Universidade de Brasília –LAMAL – UnB / Karina Azevedo Lima; orientação de Ângela Patrícia Santana. – Brasília, 2014.

37p.:il

Monografia de Graduação (G) - Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2014.

1. Laboratório de microbiologia. 2. Doenças transmitidas por alimentos. 3. Análise de alimentos. 4. Segurança alimentar. I. Santana, A.P.II. Título

## Cessão de Direitos

Nome do Autor: Karina Azevedo Lima

Título da Monografia de Conclusão de Curso: Descrição das principais atividades desenvolvidas no laboratório de microbiologia de alimentos da Universidade de Brasília – LAMAL– UnB.

Ano: 2014

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

---

KARINA AZEVEDO LIMA  
023.605.651-41

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

Nome do autor: LIMA, Karina Azevedo

Título: Descrição das principais atividades desenvolvidas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade de Brasília – LAMAL – UnB

Monografia apresentada para a conclusão do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ângela Patrícia Santana

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof<sup>a</sup>. Margareti Medeiros

Instituição: FACIPLAC

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Simone Perecmanis

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Joaquim Pereira e Maria Azevedo,  
por terem sido o meu alicerce, meu incentivo e  
minha força para que a minha formação acadêmica  
se tornasse realidade.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por ser meu guia e iluminar sempre os meus caminhos, me dando discernimento e sabedoria para lidar com as adversidades da vida, além de saúde e força para atingir os meus objetivos.

Aos meus pais, Joaquim e Maria, pelo amor e dedicação, por sempre me apoiarem em todas as minhas escolhas e por serem os responsáveis pela minha formação moral e acadêmica. Devo tudo a vocês por ter chegado até aqui.

Aos meus irmãos, André e Wilker, por sempre acreditarem no meu potencial e por me apoiar em tudo.

Ao meu melhor amigo e namorado, Regis, por sempre acreditar na minha capacidade e me fazer lembrar disso nos momentos que perdi as forças ou pensei em desistir. Por alegrar sempre os meus dias e o meu coração. Você é único e essencial na minha vida.

Aos meus grandes amigos que conquistei na graduação e que levarei comigo para sempre, André Leonardo, Keila, Juliane, Samantha, Salvador e Renata. Obrigada pelo companheirismo, cumplicidade, pela ajuda nos momentos de desespero, por todo cuidado, carinho e preocupação. Vocês são os melhores e quero vocês sempre na minha vida.

À minha querida professora e orientadora, Ângela Patrícia, pela oportunidade de aprendizagem no laboratório, por me mostrar a área que fez eu me encontrar na veterinária, pela paciência, atenção, generosidade e pelo grande exemplo de pessoa e profissional.

À técnica do LAMAL, Nara Rúbia, além de excelente profissional, um doce de pessoa, por toda paciência e carinho para ensinar, por me deixar ainda mais apaixonada por essa área e por ter tornado essa reta final menos traumática. E também ao mestrando Igor Poty, por toda atenção e por me explicar tudo com muita paciência e descontração.

Aos professores da FAV que, além de compartilharem o conhecimento serviram de exemplo moral e profissional, contribuindo, assim, por tudo que eu sou e sei hoje.

E por fim, a todas outras pessoas queridas que fizeram parte de alguma forma dessa caminhada junto comigo.

**Obrigada!!!**

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diluição em série de 3 tubos.....	13
Figura 2 - Esfregação de superfície feito com "swabs" em carcaça de frango .....	14
Figura 3 - Placa de Ágar Padrão Para Contagem com colônias de mesófilos aeróbios presentes no leite .....	16
Figura 4 - Lupa especial para contagem de mesófilos aeróbios em placa de Ágar Padrão Para Contagem em amostra de leite.....	16
Figura 5 - Representação esquemática dos procedimentos para a contagem de coliformes totais e coliformes termotolerantes.....	22
Figura 6 - Placa de Ágar Baird-Parker com colônias típicas de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	27
Figura 7 - Placa de Ágar Baird-Parker com colônias atípicas de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	27
Figura 8 - Placa de Ágar MYP com colônias de <i>Bacillus cereus</i> .....	30
Figura 9 - Placa de Ágar PEMBA com colônias de <i>Bacillus cereus</i> .....	30
Figura 10 - Câmara de anaerobiose do laboratório de microbiologia de alimentos da UnB....	36
Figura 11 - Amostras sendo incubadas na câmara de anaerobiose.....	37

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela (3 tubos): Número mais provável e intervalo de confiança a nível de 95% de probabilidade, para combinação de tubos positivos em série de três tubos com 0,1 -0,01 e 0,001g ou mL de amostra inoculada.....	23
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	9
2. Laboratório de microbiologia de alimentos da Universidade de Brasília .....	11
3. Procedimentos para o preparo das amostras para análise.....	12
3.1 Amostragem com “swabs” .....	13
4. Contagem padrão de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis .....	15
5. Contagem de bolores e leveduras.....	18
6. Número mais provável de coliformes totais e coliformes termotolerantes em água e alimentos.....	20
6.1 Água e gelo .....	20
6.2 Alimentos .....	21
7. Contagem de <i>Clostridium</i> sulfito redutores e de <i>Clostridium perfringens</i> .....	25
8. Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	26
9. Contagem de <i>Bacillus cereus</i> .....	29
10. Pesquisa de <i>Salmonella</i> .....	32
11. Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	34
12. Câmara de anaerobiose .....	36
13. Considerações Finais.....	38
14. Referências Bibliográficas .....	39



## 1. Introdução

Alguns microrganismos funcionam como indicadores, podendo ser usados para refletir a qualidade microbiológica dos alimentos em relação à vida de prateleira ou à segurança devido a presença de patógenos alimentares. Apesar de o uso geral ser para avaliar a sanidade dos alimentos, eles também podem ser usados para avaliar aspectos gerais de qualidade (COSTA, 2004).

Nesse sentido, os alimentos preservados de forma inadequada podem contribuir para o crescimento de microrganismos patógenos, ocasionando em doenças transmitidas por alimentos (DTA), de morbidade e mortalidade significativas. Um alimento contaminado proveniente de uma indústria de processamento de alimentos ou de um restaurante pode afetar um grande número de indivíduos, assim, as doenças transmitidas por alimentos correspondem a doenças de fonte comum (MADIGAN *et al.*, 2010).

O episódio em que duas ou mais pessoas apresentam os mesmos sintomas após a ingestão de alimentos e/ou água da mesma origem é caracterizado um surto de DTA. Porém, quando há o surgimento de uma doença rara, de difícil ocorrência, basta que apenas um indivíduo apresente os sintomas para que seja considerado um surto (BRASIL, 2014). Madigan *et al* (2010), relataram que a maioria dos surtos e doenças transmitidas por alimentos não são mencionadas, pois, não há uma investigação da associação entre o alimento e a doença. Segundo dados atualizados da Vigilância Epidemiológica das DTA no Brasil divulgados em Agosto de 2014, o Brasil teve 800 surtos de DTA no ano de 2013, sendo a região Sudeste com o maior número de notificações (39,8%), seguido da região Sul (38,9%) e, dentre os agentes etiológicos associados aos surtos de DTA, o *Staphylococcus aureus*, a *Salmonella spp* e a *Escherichia coli* continuam sendo os principais microrganismos causadores da doença.

De acordo com Madigan *et al* (2010), o patógeno ou a toxina presentes e transmitidos pelos alimentos pode não ser o bastante para associar os alimentos ou patógenos a um surto específico de doença transmitida por alimentos. Para isso, o agente causal deve ser isolado e identificado para completar as investigações de DTA. As amostras dos alimentos devem ser inoculadas em meios enriquecidos e transferidas posteriormente para meios diferenciais ou seletivos para o isolamento e a identificação.

Diante desse contexto, segundo Franco e Landgraf (2007), a avaliação microbiológica dos alimentos fornece informações importantes que permitem avaliar as condições de

armazenamento, processamento e distribuição para o consumo, sua vida útil e o risco à saúde da população atestando a qualidade e à segurança que o alimento oferece ao consumidor. As análises microbiológicas feitas no Brasil, são em produtos de origem animal, vegetal, na água, em suplementos minerais e vitamínicos e nos aditivos biológicos e coadjuvantes usados na tecnologia de produção de alimentos (BRASIL, 2001).

O presente trabalho propõe-se a descrever e analisar as atividades e os procedimentos utilizados, durante estágio supervisionado, realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade de Brasília (LAMAL), entre o período de Agosto a Novembro de 2014, os quais visam a detecção dos microrganismos que afetam a qualidade dos alimentos, bem como os agentes etiológicos que prejudicam a saúde dos consumidores.

## 2. Laboratório de microbiologia de alimentos da Universidade de Brasília

O Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade de Brasília (LAMAL) recebe diversos tipos de amostras de alimentos de origem animal, vegetal e água para análise microbiológica, além de swabs de bancadas, pisos, caminhões, gaiolas, facas e propés de funcionários provenientes de indústrias e estabelecimentos produtores de alimentos. Os procedimentos de análises dos alimentos, praticados no laboratório, seguem a Instrução Normativa Nº 62, de 26 de Agosto de 2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que oficializa os métodos analíticos oficiais de análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Para determinação dos microrganismos presentes em alimentos destinados ao consumo humano, o laboratório segue a Resolução RDC nº12, de 02 de Janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.

O LAMAL realiza análises microbiológicas em amostras oriundas de indústrias de alimentos, restaurantes, lanchonetes, padarias e supermercados do Distrito Federal e Entorno. A amostra a ser analisada pode apresentar-se embalada na forma que é comercializada, ou na forma que a indústria ou estabelecimento a manipula. As análises são feitas em uma grande variedade de alimentos como carnes, carcaças de frangos, leite e derivados, sanduíches, doces, água, pães, bolos, além de análises de ambiente e “swabs” de bancadas e mãos de funcionários.

Durante o período analisado, de Agosto a Novembro de 2014, as principais análises realizadas foram: contagem de mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis, contagem de bolores e leveduras, número mais provável de coliformes totais e coliformes termotolerantes em água e alimentos, pesquisa de *Salmonella*, contagem de *Clostridium* sulfito redutores a 46°C e *Clostridium perfringens*, contagem de *Bacillus cereus*, contagem de *Staphylococcus aureus*, pesquisa de *Listeria monocytogenes* além de acompanhamento sobre o funcionamento da câmara de anaerobiose onde o processamento da amostra é feito sob condições de anaerobiose estrita.

### 3. Procedimentos para o preparo das amostras para análise

O processo de análise das amostras, inicia-se com a diluição e homogeneização com um diluente adequado, para permitir a inoculação nos meios de cultura (SILVA *et al.*, 2010). A diluição caracteriza-se pela adição de uma substância a outra para reduzir a concentração de uma das substâncias, ou seja, indica que “ tantas partes de um material estão sendo diluídas em um número total de partes do produto final”( BRASIL, 2003).

Conforme a IN 62 (2003), as diluições são divididas em:

#### A. Diluições decimais

São diluições em que a quantidade da substância a ser diluída corresponde à unidade, ou múltiplos da unidade e o volume final da solução diluída é igual a 10 ou múltiplo de 10 (diluições de base 10).

#### B. Diluições decimais seriadas

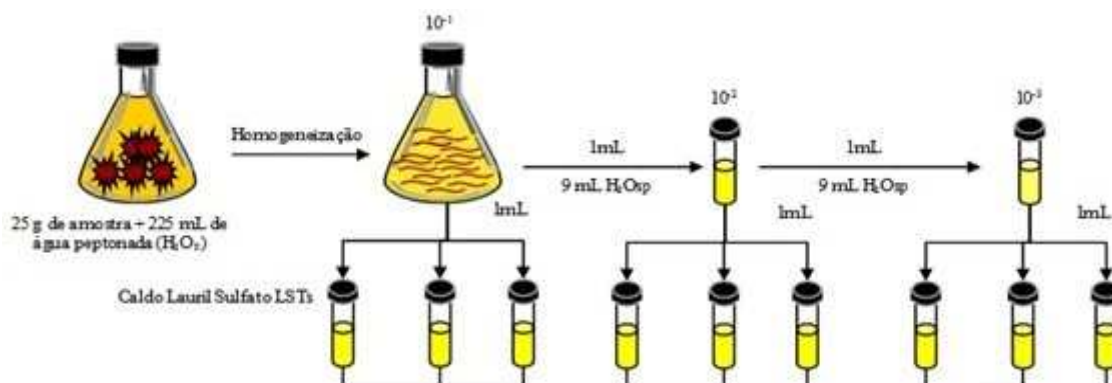
São diluições decimais preparadas em série e que possuem um fator de diluição único e igual a 10. Tem-se como exemplo, o preparo de diluições decimais de uma cultura bacteriana em fase estacionária até  $10^{-3}$ , conforme as etapas descritas abaixo:

1. Preparar uma diluição 1:10 da cultura em fase estacionária (**Figura 1**) em solução salina peptonada, isto é, misturar 1 mL da cultura em fase estacionária com 9 mL de solução salina peptonada ( $10^{-1}$ ).

2. A partir da diluição 1:10 preparada conforme item 1, após homogeneização em agitador de tubos, tomar 1 mL e misturar com 9 mL de solução salina peptonada (**Figura 1**), de forma a obter diluição 1:100 da cultura em fase estacionária ( $10^{-2}$ ).

3. A partir da diluição 1:100 preparada conforme item 2, após homogeneização em agitador de tubos, tomar 1 mL e misturar com 9 mL de solução salina peptonada (**Figura 1**), de forma a obter a diluição 1: 1000 da cultura em fase estacionária ( $10^{-3}$ ).

**Figura 1 – Diluição em série de 3 tubos**



Fonte adaptada: : Marques, Leila Larisa. Contagem de coliformes totais e coliformes termotolerantes. Disponível em: <http://slideplayer.com.br/slide/44164/#>; Acesso em nov. 2014.

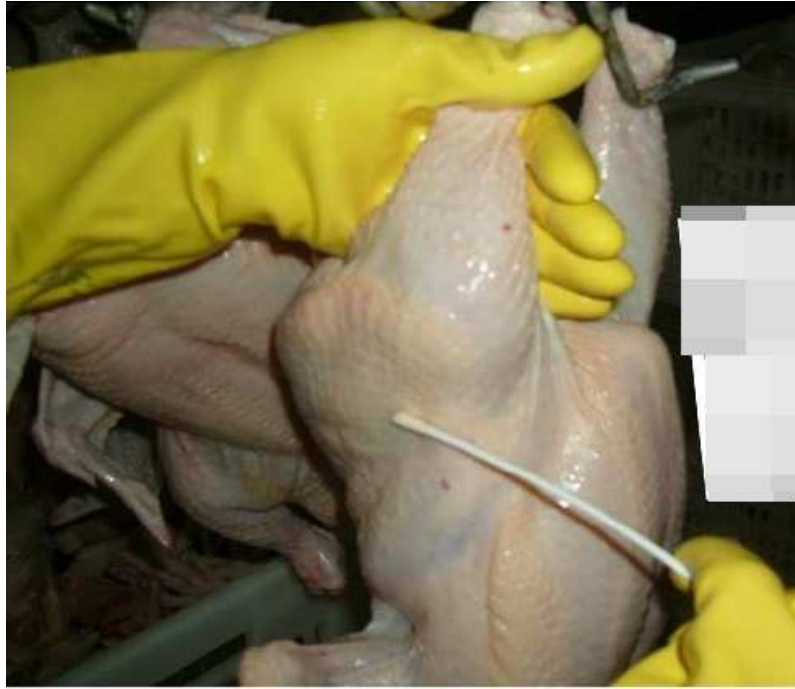
O processamento das amostras deve ser feito no interior de capelas de fluxo laminar específico para tal atividade e, perto da chama do bico de Bunsen, no caso de uso de bancada. A pesagem das amostras para a obtenção da diluição  $10^{-1}$ , deve ser feita de forma asséptica e com o uso de materiais estéreis. Deve-se pesar  $25 \pm 0,2$  gramas ou pipetar  $25 \pm 0,2$  mL da amostra e transferir para um saco “stomacher” estéril e identificado. Em seguida, proceder com a homogeneização do conteúdo do saco com 225 mL de água peptonada tamponada 1% e homogeneizar por 30 segundos a 2 minutos, dependendo do tipo de amostra, em homogeneizador automático (Aparelho de “stomacher”). Para as diluições subsequentes, transfere-se 1 mL da diluição anterior para um tubo contendo 9 mL de solução salina peptonada 0,1% (diluyente). A homogeneização dessas diluições deve ser realizada com o auxílio de agitador de tubos tipo “vortex”, por um período de tempo não superior a 60 segundos (BRASIL, 2003).

### 3.1 Amostragem com “swabs”

De acordo com Silva *et al* (2010), o esfregaço feito com “swabs” (**Figura 2**) aplica-se aos alimentos cuja contaminação é predominantemente superficial, tais como: carcaças de aves, peixes, suínos e bovinos e, também é aplicado à análise de superfícies de equipamentos, mesas, utensílios e embalagens. O esfregaço é feito com “swabs” estéreis e são colocados em tubos ou frascos com 10 mL de um diluyente adequado, sendo recomendados pelo *Compendium*

(Midura & Bryant, 2001), citados por Silva *et al* (2010), os diluentes: Água Peptonada 0,1% (H<sub>2</sub>O) ou o Tampão Fosfato pH 7,2 (PB) e pela ISO 6887-1 (1999) a Água Salina Peptonada (H<sub>2</sub>Osp) ou a Água Peptonada Tamponada (BPW).

**Figura 2 - Esfregação de superfície feito com “swabs” em carcaça de frango**



Fonte adaptada: Amostragem da unidade analítica pela técnica do esfregação de superfície “swab”. Disponível em: <https://bacilosnasopa.wordpress.com/2012/07/12/amostragem-da-unidade-analitica-pela-tecnica-do-esfregaco-de-superficie-swab/>; Acesso em nov. 2014.

#### 4. Contagem padrão de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis

A contagem padrão de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis aplica-se a amostras de água, alimentos e matérias-primas, sendo o método mais usado como indicador geral de populações bacterianas em alimentos. Essa técnica, porém, não diferencia os tipos de bactérias e nem é um indicador de segurança, apenas fornece informações gerais sobre as práticas de manufatura, matérias-primas usadas, qualidade dos produtos, condições de processamento, manipulação e vida de prateleira (SILVA *et al.*, 2010).

As diluições da amostra ou a sua semeadura são realizadas em ágar padrão para contagem (PCA) e incubadas em temperatura de  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 48 horas. O procedimento consiste da homogeneização, em saco “stomacher” por 60 segundos, de  $25 \pm 0,2\text{g}$  ou  $25 \pm 0,2\text{mL}$  da amostra com 225 mL de solução salina peptonada 0,1%. Sendo essa a diluição  $10^{-1}$ , onde é retirado 1 mL e semeado em placas de Petri estéreis e posteriormente é adicionado cerca de 15 a 20 mL de PCA fundido e mantido em banho-maria a  $46 - 48^\circ\text{C}$ . Feito isso, o ágar com o inóculo é homogeneizado e deixado em superfície plana para solidificar. As placas são incubadas invertidas a temperatura de  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 48 horas. A leitura é de acordo com o tipo de amostra em análise e a contagem de colônias, sendo que, os produtos em geral, o ideal é que as placas contenham entre 25 e 250 colônias e, nas amostras de água, as placas contenham entre 30 e 300 colônias. O resultado é obtido pela contagem das colônias nas placas, que apresentam-se com coloração branca e de forma e tamanho variável, a olho nú (**Figura 3**) ou com auxílio de uma lupa especial (**Figura 4**) e multiplicado o valor encontrado de cada placa por 10 para restabelecer a diluição  $10^0$  ou integral. O resultado é expresso em UFC/g ou mL (BRASIL, 2003).

**Figura 3 - Placa de Ágar Padrão Para Contagem com colônias de mesófilos aeróbios presentes no leite**



Fonte: Arquivo Pessoal / Karina Azevedo

**Figura 4 - Lupa especial para contagem de mesófilos aeróbios em placa de Ágar Padrão Para Contagem com amostra de leite**



Fonte: Arquivo Pessoal / Karina Azevedo

Foram realizadas, no período do estágio supervisionado, um total de 84 análises para contagem padrão de mesófilos em amostras de alimentos e em amostras ambientais. Dessas 84 análises, 70 foram de alimentos como carnes, leite, água, queijos, entre outros. E 14 foram de amostras ambientais, “swabs” de mãos de funcionários, bancadas e facas. A legislação vigente não menciona valores de tolerância em alimentos para contagem de mesófilos,



cabendo aos estabelecimentos comerciais padronizarem os valores limites de acordo com o tempo de prateleira de seus produtos.

## 5. Contagem de bolores e leveduras

Os bolores e leveduras são, em sua maioria, originários do solo ou do ar e constituem um grande grupo de microrganismos, sendo, os bolores extremamente versáteis e capazes de assimilar qualquer fonte de carbono derivada de alimentos, enquanto que, as leveduras, são mais exigentes que os bolores, sendo incapazes de assimilar nitrato e carboidratos. Algumas espécies de leveduras exigem vitaminas e outras, como *Zygosaccharomyces bailii*, não conseguem utilizar a sacarose como única fonte de carbono. Esses fatores de exigências acabam limitando o número de alimentos susceptíveis à deterioração por leveduras (SILVA, *et al.*, 2010).

Esses microrganismos são bastante resistentes ao pH ácido e atividade de água baixa. Os bolores são formados por filamentos denominados hifas, que, em conjunto, formam o micélio. O micélio é o responsável pelo aspecto seco, compacto, aveludado, gelatinoso e com várias colorações que são características das colônias formadas. Já as leveduras são definidas como fungos cuja forma predominante é unicelular. Elas podem ser esféricas, ovóides, cilíndricas ou triangulares e algumas são bastante alongadas formando filamentos semelhantes às hifas dos bolores. As leveduras requerem menos umidade que a maioria das bactérias e mais umidade que a maioria dos bolores para seu crescimento (FRANCO e LANDGRAF, 2007).

Segundo Brasil (2003), a contagem de bolores e leveduras aplica-se a matérias-primas, alimentos e rações. A técnica tem como objetivo verificar a capacidade desses microrganismos de se desenvolverem em meios de cultura acidificados com pH próximo a 3,5 e temperatura de incubação de  $25 \pm 1^\circ \text{C}$ . O uso de meios acidificados promove seletivamente o crescimento de fungos e inibe a maioria das bactérias presentes no alimento. O procedimento é feito através da inoculação, em placa de Petri estéril, de 0,1 mL da diluição  $10^{-1}$  que é acidificada até o pH 3,5 por meio da adição de 0,3 mL de solução de ácido tartárico 10% , isso inibe o crescimento das bactérias presentes no alimento e seleciona apenas os fungos. É adicionado a placa, 20 mL de ágar batata glicose 2%, onde o conteúdo é homogeneizado manualmente e posteriormente é deixado em superfície plana para solidificar. A placa é incubada invertida a  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  por 5 a 7 dias. O resultado é obtido através da contagem das colônias presentes na placa, que se apresentam de forma, tamanho e coloração variável, e multiplica-se o resultado por 10 para restabelecer a diluição  $10^0$  ou integral e

depois multiplica-se por 10 novamente para retornar a quantidade padrão devido ao uso de 0,1 mL da amostra. O resultado é expresso em UFC/g ou mL.

Foram realizadas, no período do estágio supervisionado, 43 análises para contagem de bolores e leveduras em diversos alimentos. Assim como ocorre na contagem de mesófilos, a legislação não estabelece valores limites de tolerância para contagem de bolores e leveduras. Cabe o estabelecimento avaliar o limite tolerável, relacionando com o período de prateleira de seus produtos.

## **6. Número mais provável de coliformes totais e coliformes termotolerantes em água e alimentos**

Conforme Silva *et al* (2010), a técnica do número mais provável (NMP) consiste no método de análise quantitativo que permite determinar o NMP dos microrganismos alvos na amostra, pela inoculação de alíquotas dessa amostra em uma série de tubos, contendo um meio de cultura líquido que fornece substrato para o crescimento desses microrganismos. Com a inoculação feita em líquidos, a técnica do NMP possibilita inocular quantidades maiores da amostra, o que aumenta proporcionalmente o volume de meio de cultura. Isso faz com que a sensibilidade da detecção dos microrganismos seja maior. Essa técnica é aplicável na contagem de coliformes totais e coliformes termotolerantes em água e alimentos.

### **6.1 Água e gelo**

Para a determinação do número mais provável, as amostras são analisadas em dois testes: prova presuntiva e prova confirmativa.

Na prova presuntiva, a inoculação da amostra é feita em caldo lauril sulfato de sódio, onde a presença de coliformes é evidenciada pela formação de gás produzido pela fermentação da lactose contido no meio, nos tubos invertidos (tubos de Durham) que são colocados dentro dos tubos de caldo lauril antes da esterilização. Antes de proceder a inoculação, recomenda-se, no caso da água, homogeneizar a amostra, enquanto que o gelo deve-se deixar descongelar no próprio reservatório, sob refrigeração, e depois homogeneizar. Para analisar a amostra nessa fase, deve-se inocular volumes de 10 mL da amostra em uma série de três tubos contendo caldo lauril sulfato de sódio em concentração dupla, inocular volumes de 1 mL da amostra na segunda série de 3 tubos contendo caldo lauril sulfato de sódio em concentração simples e volumes de 1 mL da diluição  $10^{-1}$  na terceira série de 3 tubos contendo o mesmo meio. Os tubos devem ser incubados a  $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 a 48 horas. A leitura é feita pela formação de gás nos tubos de Durham ou efervescência, quando agitado suavemente, evidenciando a suspeita de coliformes totais. O número de tubos positivos devem ser anotados (BRASIL, 2003).

Na prova confirmativa, são feitas inoculações para coliformes totais e coliformes termotolerantes. Para coliformes totais, é feita a inoculação dos tubos positivos para a fermentação de lactose, na prova presuntiva, em tubo contendo caldo verde brilhante bile 2%

lactose (VBBL) e incubado a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 a 48 horas. A confirmação da presença de coliformes totais é pela formação de gás nos tubos de Durham do caldo verde brilhante ou efervescência quando agitado gentilmente, evidenciando a fermentação da lactose presente no meio. Deve-se anotar o número de tubos positivos em cada série de diluição (BRASIL, 2003).

Já para coliformes termotolerantes, a inoculação é feita em caldo EC, dos tubos positivos de caldo lauril sulfato de sódio obtidos na prova presuntiva. Os tubos são incubados a  $45 \pm 0,2^\circ\text{C}$ , por 24 a 48 horas. A presença de coliformes termotolerantes é confirmada pela formação de gás ou efervescência quando agitado suavemente. Deve-se anotar o resultado obtido para cada tubo e a diluição utilizada (BRASIL, 2003).

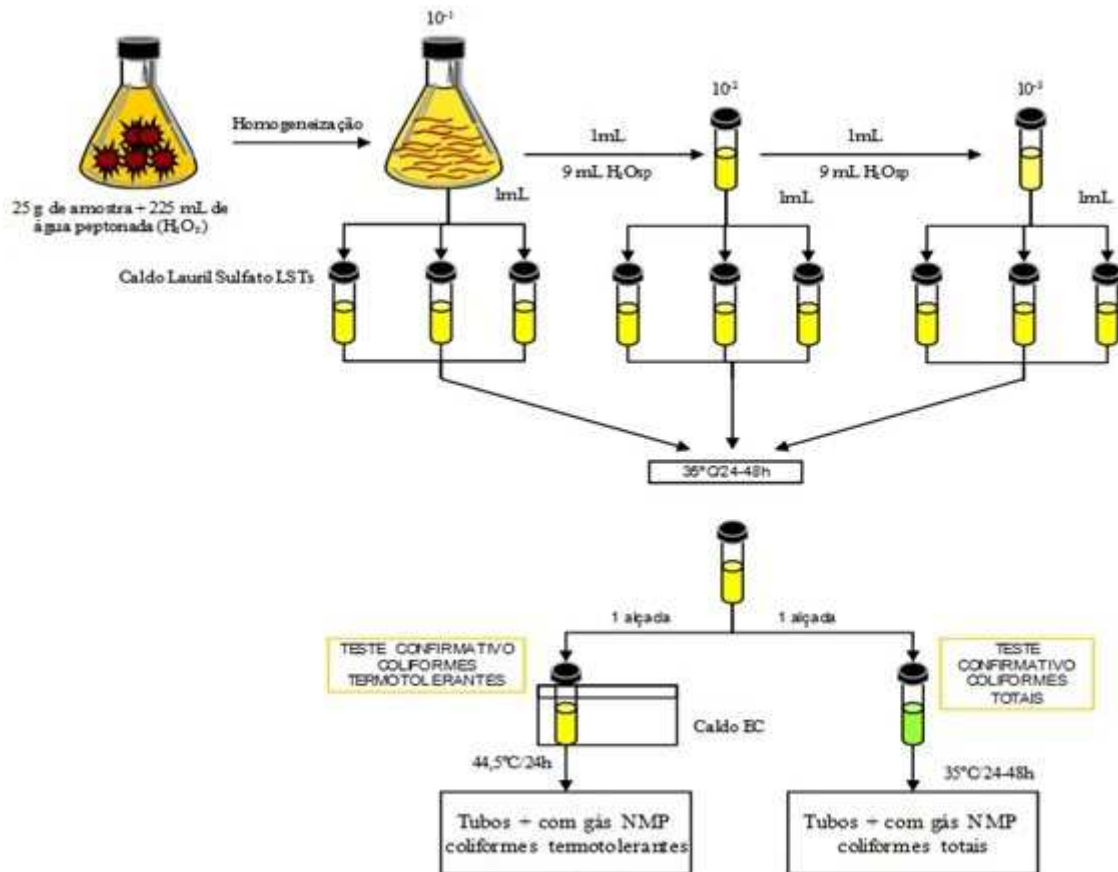
## 6.2 Alimentos

Assim como na água, os alimentos que são submetidos a essa técnica, passam por duas provas: a presuntiva e a confirmativa.

Na prova presuntiva (**Figura 5**), inocula-se 1mL da amostra em 3 séries com 3 tubos em cada, contendo caldo lauril sulfato de sódio, sendo que é inoculado 1 mL da diluição  $10^{-1}$  na primeira série, 1 mL da diluição  $10^{-2}$  na segunda série e 1 mL da diluição  $10^{-3}$  na terceira série. Os tubos são incubados a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 a 48 horas e, a leitura é feita pela observação da formação de gás, nos tubos de Duhran, e a turvação do caldo em cada trinca de tubos. Os tubos positivos em cada trinca devem ser anotados (BRASIL, 2003).

Na prova confirmativa (**Figura 5**), as inoculações são feitas para coliformes totais e coliformes termotolerantes. Para coliformes totais, a confirmação da presença desses microrganismos é feita pela inoculação das colônias suspeitas em caldo verde brilhante bile 2% lactose (VBBL) e incubado à uma temperatura de  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 a 48 horas. A confirmação se dá pela presença de gás no tubo de Duhran e turvação do caldo. Para coliformes termotolerantes, inocula-se as colônias suspeitas em caldo EC e incuba em temperatura de  $45 \pm 0,2^\circ\text{C}$  por 24 a 48 horas. A leitura é semelhante a feita para coliformes totais (BRASIL, 2003).

**Figura 5 – Representação esquemática dos procedimentos para a contagem de coliformes totais e coliformes termotolerantes**



Fonte adaptada: Marques, Leila Larisa. Contagem de coliformes totais e coliformes termotolerantes. Disponível em: <http://slideplayer.com.br/slide/44164/#>; Acesso em nov. 2014.

A tabela abaixo, adaptada de Blodgett (2006) e citada por Silva *et al* (2010), mostra a verificação do NMP através da combinação de números equivalentes aos tubos que apresentaram resultado positivo em cada um dos testes confirmativos para coliformes totais e coliformes termotolerantes. O valor encontrado é expresso em NMP/g ou mL (Brasil, 2003).

Tabela 1 - Tabela (3 tubos): Número mais provável e intervalo de confiança a nível de 95% de probabilidade, para combinação de tubos positivos em série de três tubos com 0,1 -0,01 e 0,001g ou mL de amostra inoculada.

Combinação de tubos +			NMP/g ou mL	Intervalo de Confiança 95%	
0,1	0,01	0,001		Mínimo	Máximo
0	0	0	<3	-	9,5
0	0	1	3,0	0,15	9,6
0	1	0	3,0	0,15	11
0	1	1	6,1	1,2	18
0	2	0	6,2	1,2	18
0	3	0	9,4	3,6	38
1	0	0	3,6	0,17	18
1	0	1	7,2	1,3	18
1	0	2	11	3,6	38
1	1	0	7,4	1,3	20
1	1	1	11	3,6	38
1	2	0	11	3,6	42
1	2	1	15	4,5	42
1	3	0	16	4,5	42
2	0	0	9,2	1,4	38
2	0	1	14	3,6	42
2	0	2	20	4,5	42
2	1	0	15	3,7	42
2	1	1	20	4,5	42
2	1	2	27	8,7	94
2	2	0	21	4,5	42
2	2	1	28	8,7	94
2	2	2	35	8,7	94
2	3	0	29	8,7	94
2	3	1	36	8,7	94
3	0	0	23	4,6	94
3	0	1	38	8,7	110
3	0	2	64	17	180
3	1	0	43	9	180
3	1	1	75	17	200
3	1	2	120	37	420
3	1	3	160	40	420
3	2	0	93	18	420
3	2	1	150	37	420
3	2	2	210	40	430
3	3	3	290	90	1.000
3	3	0	240	42	1.000
3	3	1	460	90	2.000
3	3	2	1.100	180	4.100
3	3	3	> 1.100	420	-

Fonte adaptada: *Bacteriological Analytical Manual* (Blodgett, 2006)

Foram realizadas, no período do estágio supervisionado, 165 análises para determinar o número mais provável de coliformes totais e coliformes termotolerantes em diversas amostras de alimentos, tais como, sucos de frutas, arroz, doce de leite com coco, tomate, bebidas lácteas, pães, sanduíches, além de amostras de água de torneira, água de caixa d'água e água mineral. A legislação vigente não menciona valores limites para o NMP de coliformes totais e coliformes termotolerantes, cabe a cada estabelecimento estipular seus valores de limites aceitáveis sem que o produto perca sua qualidade.



## 7. Contagem de *Clostridium* sulfito redutores e de *Clostridium perfringens*

A técnica baseia-se na inoculação da amostra ou de uma diluição da mesma em meios de cultura seletivos. Para isso, é necessário cultivar 1 mL da diluição  $10^{-1}$  em placa de Petri estéril e adicionar de 15 a 20 mL de ágar TSC (Tryptose Sulfito Cicloserina), homogeneizar e esperar solidificar em superfície plana. Esse procedimento é repetido mais duas vezes para que seja estabelecido um meio anaeróbico para favorecer o crescimento da bactéria. Após a solidificação do ágar, a placa é incubada, sem inverter, em jarra de anaerobiose a  $46 \pm 1^\circ \text{C}$  por 18 a 24 horas. O resultado se dá pela contagem das colônias na placa, multiplicado por 10 para restabelecer a diluição padrão ou inicial. O resultado é expresso em UFC/g. As colônias de *Clostridium* sulfito redutores são negras e de tamanho variável de 1 a 3 mm no ágar TSC (BRASIL, 2003).

As bactérias pertencentes ao gênero *Clostridium* são bacilos anaeróbios, formadores de endósporos e, alguns de seus membros, tais como o *Clostridium perfringens* e o *Clostridium botulinum*, são causadores de graves intoxicações alimentares. Os procedimentos de enlatamento e cocção matam os microrganismos, sem necessariamente matar os endósporos que, em condições anaeróbias adequadas, germinam e produzem a toxina. O *Clostridium perfringens* é um bacilo anaeróbio Gram- positivo formador de endósporos, encontrado no solo e também no trato intestinal de vários animais e humanos. A intoxicação alimentar é resultado da ingestão de uma grande dose de *Clostridium perfringens* ( $>10^8$  células), presente em alimentos cozidos ou crus contaminados, principalmente alimentos com alto teor de proteínas, como carnes, aves e peixes (MADIGAN, *et al.*, 2010).

Os clostrídios que reduzem o sulfito a sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ) a  $46^\circ\text{C}$ , são os *Clostridium* sulfito redutores. Na análise de alimentos, a presença desses clostrídios é oferecer uma indicação simples e rápida da potencial presença de *Clostridium perfringens*, que também é um sulfito redutor que cresce bem a uma temperatura de  $46^\circ\text{C}$ , sendo essa temperatura utilizada para dar uma indicação mais precisa de *C. perfringens*, reduzindo o número de espécies que podem crescer. (SILVA, *et al.*, 2010).

Foram analisadas, no período de estágio supervisionado, 26 amostras para contagem desses microrganismos em carne, farinha de vísceras, torta de frango, bauru, pão de batata, lasanha bolonhesa, salmão e sanduíches naturais. Todas as análises tiveram uma contagem inferior a 1,0 UFC/g.

## 8. Contagem de *Staphylococcus aureus*

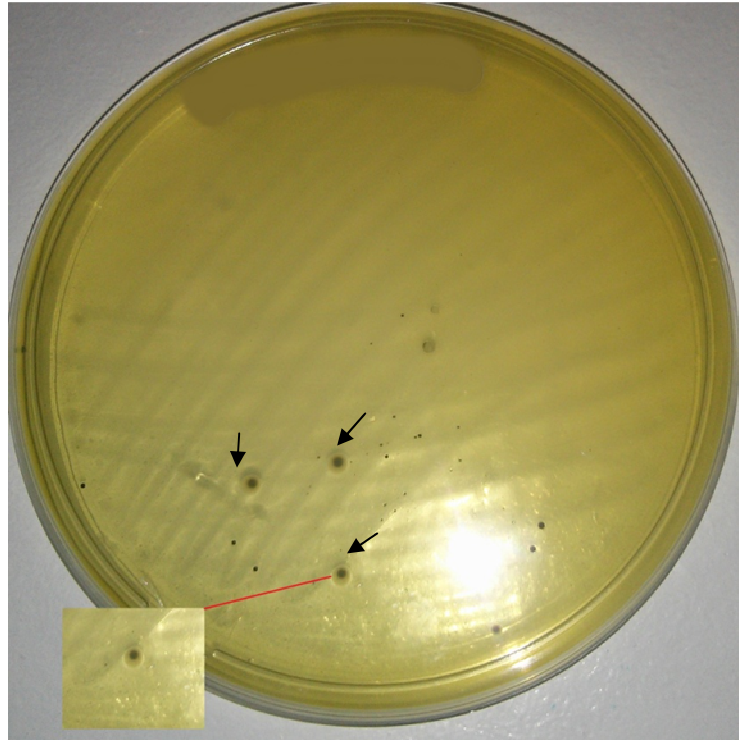
Os *Staphylococcus* spp. são caracterizados como pequenos cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos e, são encontrados normalmente na microbiota local da pele e do trato respiratório superior de praticamente todos os seres humanos. As toxinas produzidas pela bactéria *Staphylococcus aureus*, são frequentemente causadoras de intoxicação alimentar devido à capacidade dessa bactéria de crescer em vários alimentos, tais como, produtos assados contendo creme ou recheados de creme, aves domésticas, carne e produtos cárneos, etc., e algumas linhagens produzirem várias enterotoxinas termoestáveis. Não é necessária a presença de *Staphylococcus aureus* vivos nos alimentos para que a doença ocorra, a mesma decorre apenas da presença da toxina pré-formada (MADIGAN *et al*, 2010).

Segundo Brasil (2003), o procedimento para contagem de *S.aureus* aplica-se a matérias-primas e alimentos, sendo que, os produtos que tiverem como destino o comércio no MERCOSUL, a contagem final irá se referir a apenas a *Staphylococcus* coagulase positiva.

Para realizar a contagem de *Staphylococcus aureus* presentes nas amostras, deve-se inocular 0,1 mL da diluição inicial  $10^{-1}$  sobre a superfície seca do meio de cultura ágar Baird-Parker presente em placa de Petri estéril e espalhar cuidadosamente o inóculo com o auxílio de tubo estéril ou alça de Drigalski, até a sua completa absorção. A placa de Petri contendo o inóculo deve ser incubada invertida sob uma temperatura de  $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 30 a 48 horas (BRASIL, 2003).

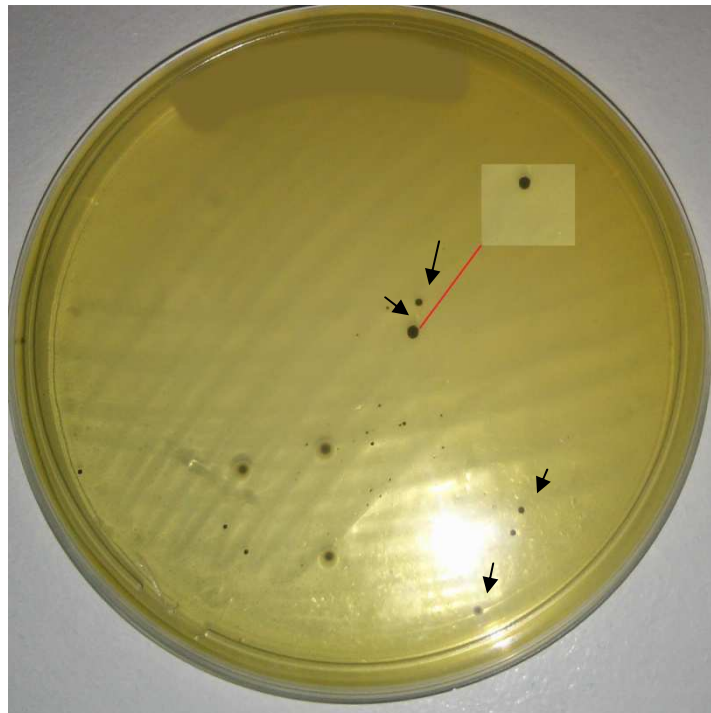
O ágar Baird-Parker, suplementado com solução de gema de ovo, possibilita a verificação das atividades proteolítica e lipolítica do *Staphylococcus aureus* por meio do surgimento de um halo de transparência e um de precipitação ao redor da colônia. Sendo que, as colônias típicas (**Figura 6**) são caracterizadas por serem negras brilhantes com anel opaco e rodeadas por um halo claro, transparente e destacado sobre a opacidade do meio. Já as colônias atípicas (**Figura 7**) são acizentadas ou negras brilhantes, sem halo ou com apenas um dos halos (BRASIL, 2003).

**Figura 6 - Placa de Ágar Baird-Parker com colônias típicas de *Staphylococcus aureus***



Fonte: Arquivo Pessoal / Karina Azevedo

**Figura 7 - Placa de Ágar Baird-Parker com colônias atípicas de *Staphylococcus aureus***



Fonte: Arquivo Pessoal / Karina Azevedo

A leitura é a partir da contagem de colônias típicas e atípicas. Se a placa apresentar apenas colônias típicas, deve-se multiplicar o resultado obtido por 10 para restabelecer a diluição integral ou  $10^0$  e depois multiplicar por 10 de novo para voltar a quantidade padrão, pois, foi usado apenas 0,1 mL da diluição  $10^{-1}$ . As colônias típicas encontradas, devem ser utilizadas no teste de coagulase. No caso da placa apresentar colônias típicas e atípicas, deve-se multiplicar, separadamente, os resultados obtidos de ambas as colônias por 10 para restabelecer a diluição integral ou  $10^0$  e depois multiplicar por 10 novamente para retornar a quantidade padrão, pois, foi utilizado apenas 0,1 mL da diluição  $10^{-1}$ . Assim, terão dois valores, um para colônias típicas e outro para atípicas. O teste de coagulase deve ser feito com as colônias típicas encontradas (BRASIL, 2003).

De acordo com Brasil (2003), o teste de coagulase baseia-se na comprovação da capacidade de coagular o plasma de coelho pela ação da enzima coagulase produzida pelo *Staphylococcus aureus*. O teste consiste na seleção e semeadura de 3 a 5 colônias típicas em tubos de cultivo contendo 0,3 mL de caldo BHI e posteriormente transferido para tubos estéreis contendo 0,3 mL de plasma de coelho que devem ser incubados a uma temperatura de  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 6 horas. A presença de coágulos é verificada considerando os seguintes critérios:

**Reação negativa:** Não formação de coágulo;

**Reação 1+:** Coágulo pequeno e desorganizado;

**Reação 2+:** Coágulo pequeno e organizado;

**Reação 3+:** Coágulo grande e organizado;

**Reação 4+:** Coagulação de todo o conteúdo do tubo que não se desprende mesmo quando o tubo é invertido.

O teste de coagulase é considerado positivo para *Staphylococcus aureus* quando a reação de coagulação for do tipo 3+ e 4+. Quando a reação de coagulação for negativa, o teste é negativo para *Staphylococcus aureus*. Se a reação for duvidosa, do tipo 1+ e 2+, deve-se repicar do mesmo caldo de cultura para um tubo com ágar estoque ou caldo BHI e incubar a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 horas para a realização de testes complementares (BRASIL, 2003).

Foram realizadas, no período de estágio supervisionado, 61 análises para contagem de *Staphylococcus aureus* em amostras de carnes, bebidas lácteas, pães, pão de queijo, queijos e sanduíches. Apenas em uma amostra de pão de queijo houve contagem acima do limite tolerado pela legislação vigente. O resultado encontrado foi de  $1,1 \times 10^4$  UFC/g e o limite tolerado é de  $10^3$  UFC/g, o que significa que este alimento não estava apto para o consumo.

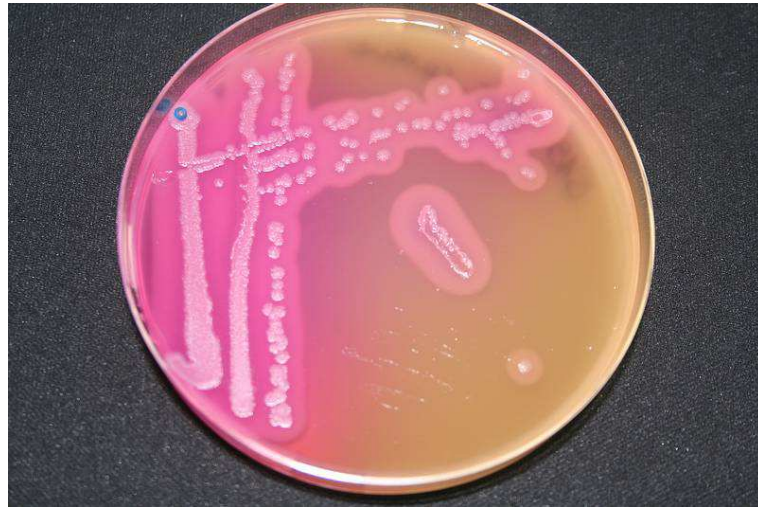
## 9. Contagem de *Bacillus cereus*

O *Bacillus cereus* é uma bactéria patogênica alimentar que se desenvolve em alimentos cozidos e mantidos em temperatura ambiente para o resfriamento lento, tais como: arroz, massas, carnes ou molhos (MADIGAN *et al*, 2010). A International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMS, 2002), citada por Silva *et al* (2010), classifica as doenças transmitidas por alimentos pelo *Bacillus cereus* no grupo de risco III, devido o caráter das doenças ser de perigo moderado, de curta duração e sem ameaça de morte ou sequelas.

De acordo com Silva *et al* (2010), o *Bacillus cereus* é uma bactéria Gram positiva, esporogênica, anaeróbia facultativa e produz esporos facilmente na maioria dos meios de cultura. Forsythe (2002) relata que, as intoxicações alimentares causadas pela bactéria, são denominadas de síndrome diarreica e síndrome emética. Sendo a síndrome diarreica causada por uma enterotoxina diarreica que é inativada a 56°C por 30 minutos e provoca episódios de dores abdominais e diarreia, enquanto que a síndrome emética se caracteriza por náusea e vômito e é causada por uma toxina emética resistente ao calor e que pode suportar o cozimento. Alimentos como carnes, leites, vegetais e peixes foram associados ao tipo diarreico de intoxicação, enquanto que os produtos de arroz e outros alimentos ricos em amido, foram associados a surtos do tipo emético.

Conforme Brasil (2003), a contagem de *Bacillus cereus* é feita pelo método de plaqueamento direto, a partir da inoculação de 0,1 mL da diluição inicial  $10^{-1}$  sobre a superfície seca do ágar polimixina gema de ovo vermelho de fenol (MYP) ou ágar cereus (PEMBA). Deve-se espalhar o inóculo cuidadosamente por toda a superfície do meio com o auxílio da alça de Drigalski ou tubo estéril e incubar as placas invertidas a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  por 30 a 48 horas. A leitura é feita pela contagem da formação de colônias rodeadas por um halo de precipitação opaco sobre um fundo róseo no ágar MYP (**Figura 8**) e azul turquesa com aspecto recortado e rodeado por halo de precipitação de lecitina hidrolizada no ágar PEMBA (**Figura 9**).

**Figura 8 - Placa de Ágar MYP com colônias de *Bacillus cereus***



Fonte: Bioreference.de Disponível em:  
<http://www.kontrollstaemme.de/eshop/singleview/bid/78/produkt/bacillus-cereus.html>;  
Acesso em out. 2014

**Figura 9 - Placa de Ágar PEMBA com colônias de *Bacillus cereus***



Fonte: Biochemical-series. Disponível em: <http://www.godowell.net/Biochemical-series/BACILLUS-CEREUS-SELECTIVE-AGAR-/>;  
Acesso em out.2014.

Foram realizadas, no período do estágio supervisionado, 28 análises para contagem de *Bacillus cereus* em arroz , feijão com farinha de mandioca, arroz branco, pão de queijo congelado, pão croissant, sanduíche, dentre outros alimentos. Em todas as análises não foi comprovado contagem com valores significativos ou próximos aos valores máximos tolerados pela Resolução RDC nº12, de 02 de Janeiro de 2001.

## 10. Pesquisa de *Salmonella*

Franco e Landgraf (2007), descrevem as bactérias do gênero *Salmonella*, como bacilos Gram-negativos, não esporulados, anaeróbios facultativos, sendo a maioria móvel. Seu principal reservatório é o trato gastrointestinal do homem e de animais, principalmente suínos e aves. A doença gastrointestinal proveniente da infecção por *Salmonella* presente em alimentos é denominada salmonelose.

Os tratos intestinais de humanos e animais de sangue quente, constituem as principais fonte de *Salmonella* transmitida por alimentos. Pessoas que manipulam alimentos e que possuem péssimos hábitos de higiene facilitam que o microrganismo tenha acesso ao alimento. Animais que são destinados à produção de alimentos, como os frangos, porcos e bois, também possuem os tipos de *Salmonella* patogênicas ao homem e podem disseminar essas bactérias a alimentos frescos, como ovos, carne e leite. As infecções alimentares causadas por *Salmonella* estão associadas a ingestão de produtos preparados à base de ovos crus, carnes, produtos cárneos, carnes curadas porém cruas e produtos lácteos (MADIGAN *et al*, 2010).

Ainda de acordo com Madigan *et al* (2010), a enterocolite é a manifestação mais comum de salmonelose. A ingestão de alimentos contaminados com *Salmonella* viáveis culmina na colonização do intestino delgado e grosso. Os indivíduos afetados pela doença, mesmo depois de recuperados, permanecem assintomáticos e eliminam as cepas da bactéria nas fezes por meses ou anos.

A identificação da presença de *Salmonella* em produtos alimentícios se dá pela cultura do microrganismo em meios de cultura seletivos e testes bioquímicos (MADIGAN *et al*, 2010). Segundo Brasil (2003), a metodologia analítica para a detecção de *Salmonella spp* se aplica a amostras de alimentos de origem animal, rações e ingredientes.

O processo de detecção da presença do microrganismo ocorre em três fases: pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo e isolamento (BRASIL, 2003).

- **Pré-enriquecimento:** é feita a incubação de  $25 \pm 0,2$  g ou  $25 \pm 0,2$  mL da amostra, adicionada de 225 mL do diluente específico, a uma temperatura de  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 16 a 20 horas. Esse procedimento tem como objetivo diminuir os efeitos do processamento industrial sem inativar biologicamente as células de *Salmonella*. O uso de diluente específico, como a solução salina peptonada tamponada, favorece a manutenção do pH e evita que as bactérias acompanhantes acidifiquem o meio, prejudicando a recuperação das células da bactéria;



- **Enriquecimento seletivo:** se faz em meios líquidos seletivos com substâncias que impedem o crescimento da maioria de microrganismos interferentes. São utilizados como meios líquidos seletivos, o caldo Rappaport Vassiliadis e o caldo Selenito-Cistina. A presença de verde malaquita e de cloreto de magnésio, no caldo Rappaport Vassiliadis, sob uma temperatura de  $41 \pm 0,5$  °C por 24 a 30 horas, atua como agentes seletivos da microbiota acompanhante, enquanto que a presença de peptona de farinha de soja estimula o crescimento de *Salmonella*. No caldo Selenito-Cistina, o selenito de sódio atua inibindo os coliformes e enterococos. Nessa fase, inocula-se 0,1 mL de amostra pré-enriquecida em um tubo contendo 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis e 1 mL de amostra pré-enriquecida em outro tubo contendo 10 mL de Selenito-Cistina. Ambos os tubos são incubados a uma temperatura de  $41 \pm 0,5$ °C por 24 a 30 horas.
- **Isolamento:** se faz a partir da repicagem da solução, contida nos tubos com caldos seletivos de enriquecimento, em superfície previamente seca de placas de Petri contendo o Ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose (BPLS) e, com auxílio da alça, estria-se a solução de forma a se obter colônias isoladas. Assim, a partir da placa de ágar BPLS, serão obtidas duas placas, uma originária do caldo Rappaport Vassiliadis e outra do caldo Selenito-Cistina. As placas são incubadas invertidas a uma temperatura de  $36 \pm 1$ °C por 18 a 24 horas. A leitura é feita pela identificação das colônias de *Salmonella* que se apresentam incolores ou de cor rosada, entre translúcidas a ligeiramente opacas no ágar BPLS. Quando rodeadas por microrganismos fermentadores de lactose, podem apresentar-se de cor verde-amarelada.

Foram realizadas, no período do estágio supervisionado, 102 análises para pesquisa de *Salmonella* em vários alimentos destinados ao consumo humano, tais como, sucos de frutas, arroz, doces, carnes, embutidos peixes, etc. Em todas as análises não foram confirmadas presença de *Salmonella*.

## 11. Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

Segundo Hobbs e Roberts (1999), a *Listeria monocytogenes* é encontrada nas condições de umidade nas fábricas de alimentos e, por isso, a manutenção de um ambiente seco se faz necessária para que a sobrevivência e disseminação dessa bactéria seja desfavorecida. Madigan *et al* (2010), relataram que a infecção alimentar gastrointestinal causada pela *Listeria monocytogenes* e que pode levar à bacteremia e meningite é denominada listeriose.

A *Listeria monocytogenes* é um cocobacilo curto, Gram-positivo, não forma esporos, tolerante ao ácido, sal e frio e é aeróbio facultativo. Ela é um patógeno intracelular e invade o corpo através do trato gastrointestinal após a ingestão de alimento contaminado (MADIGAN *et al*, 2010). Os organismos do grupo da *Listeria* são capazes de crescer lentamente sob condições de baixas temperaturas e isso lhes confere uma vantagem adicional na sobrevivência em alimentos resfriados estocados sob condições de temperaturas reduzidas (HOBBS e ROBERTS, 1999).

Conforme Brasil (2003), a metodologia analítica para a detecção de *Listeria monocytogenes*, aplica-se a todos alimentos cárneos e lácteos. As análises são divididas em quatro etapas descritas abaixo:

- **Enriquecimento seletivo:** é realizado em duas etapas, sendo a primeira feita no caldo da Universidade de Vermont Modificado (UVM) adicionado dos suplementos ácido nalidíxico e acriflavina, que tem a finalidade de inibir o crescimento da flora acompanhante, e a segunda etapa é feita no caldo Fraser (FB) adicionado dos suplementos cloreto de lítio, ácido nalidíxico e acriflavina que também possuem efeito seletivo. Na primeira fase, as amostras são homogeneizadas e incubadas a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 horas. Na segunda fase, após a incubação, transfere-se 0,1 mL da cultura pra outro tubo contendo 10 mL de caldo Fraser e incuba novamente a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 horas.
- **Isolamento:** para isolar em amostras de produtos cárneos, utiliza-se alça de platina de 5mm de diâmetro e repica do caldo Fraser para placas de Petri contendo ágar triptose com ácido nalidíxico (ATN) e placas com ágar palcam (AP). As placas de ATN são incubadas a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 horas e as placas de AP a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 a 48 horas. O isolamento em produtos lácteos é feito através da repicagem com alça de platina da amostra do caldo Fraser para placas contendo ágar oxford (AO) suplementado e placas contendo AP suplementado.

- **Seleção:** seleciona-se, com o auxílio de lupa ou estereoscópio, 3 a 5 colônias de cor azulada ou azul acizentada em ATN e com o auxílio de conta-colônias ou estereoscópio, seleciona-se colônias pretas rodeadas por halo escuro em AO. Em AP, seleciona-se colônias verde-amareladas rodeadas por zona escura ou colônias verde-acizentadas com auxílio de estereoscópio e conta-colônias.
- **Confirmação:** nessa etapa, são realizados primeiros os testes presuntivos de *Listeria sp.* O mesmo inóculo é repicado para tubos com ágar estoque e placas contendo ATN e incubados a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 horas. Posteriormente, são feitas três provas: da catalase, onde o desprendimento de bolhas de oxigênio traduz a presença de catalase, e a partir dessa cultura de catalase positiva faz o esfregaço para coloração de Gram onde a *Listeria sp* se apresenta com bastonete curto ou na forma de cocobacilo. A outra prova é da motilidade típica onde inocula-se uma alíquota da cultura em ágar motilidade e incuba em estufa de demanda biológica de oxigênio (B.O.D) a  $22 - 25^\circ\text{C}$  por 2 a 5 dias. O crescimento móvel característico dessa bactéria é em forma de guarda-chuva. E a terceira prova é de redução de nitrato que é feita após a leitura de motilidade e é adicionado a cada tubo, 2 a 3 gotas de alfa-naftilamina 0,5 % e 2 a 3 gotas de ácido sulfanílico a 0,8%. O surgimento de coloração rosa indica positividade. Após esses testes, as culturas que tenham confirmado as características do gênero *Listeria*, são testadas para a diferenciação de *Listeria monocytogenes* através de provas bioquímicas. São elas: produção de  $\alpha$ -hemólise que é confirmada pelo aparecimento de zona clara transparente ao redor das colônias que se formaram em cultivos feitos em ágar sangue desfibrinado de cobaia ou carneiro (ACNS). A outra prova é chamada de CAMP teste e é feito em ágar Columbia com suplementos, onde traça-se uma linha previamente semeada com *Staphylococcus aureus* que após incubado a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 72 horas, em atmosfera de 2 a 5% de dióxido de carbono, apresenta uma zona clara de hemólise total acentuada próxima a linha de crescimento do *S.aureus*, evidenciando a presença de *Listeria monocytogenes*.

O resultado deve ser expresso como: Pesquisa de *Listeria monocytogenes*: Presença /25g ou mL e Pesquisa de *Listeria monocytogenes*: Ausência /25g ou mL. Considera como *Listeria monocytogenes* as culturas que apresentarem as reações típicas nas provas bioquímicas (BRASIL, 2003).

Foram analisadas, no período do estágio supervisionado, 100 amostras para pesquisa de *Listeria monocytogenes* em, carnes e “swabs” de ambiente de indústrias alimentícias. Não foi confirmada a presença de *Listeria monocytogenes* em nenhuma das amostras analisadas.

## 12. Câmara de anaerobiose

Rodrigues (2006), descreve a câmara de anaerobiose (**Figura 10**), como uma câmara de fluxo laminar que funciona segundo um sistema de evacuação / substituição, onde existe uma porta por onde se introduz os meios de cultura e na qual existe a própria estufa de incubação, ou seja, todo o processamento da amostra é feito sob condições de anaerobiose e permite o uso das técnicas de cultura convencionais.

Apesar das bactérias anaeróbias não serem capazes de fixar o oxigênio devido ao fato deste ser um franco inibidor do seu crescimento, elas são nutricionalmente muito exigentes e requerem meios de cultura suplementados com vitaminas, coenzimas e fatores de crescimento, que simulam o habitat natural das bactérias, como o sangue, soro animal e glicose. Os meios de cultura ideais para o cultivo desses microrganismos, sob condições de anaerobiose, devem ser frescos, preparados sob temperatura superior a 60 °C ou terem sido pré-reduzidos, ou seja, mantidos em anaerobiose antes de ser semeado. Os meios de cultura mais utilizados para isolamento de anaeróbios são Columbia, Ágar, Beryner- Ágar ou caldo (RODRIGUES, 2006).

De acordo com Rodrigues (2006), a incubação em anaerobiose (**Figura 11**), deve ser sob uma temperatura habitual de 37° C, pois, pretende-se que a incubação seja em atmosfera sem O<sub>2</sub> livre, mas, que seja composta por 5% H<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 80% N<sub>2</sub>.

**Figura 10: Câmara de anaerobiose do laboratório de microbiologia de alimentos - UnB**



Fonte: Arquivo Pessoal / Karina Azevedo

**Figura 11: Amostras sendo incubadas na câmara de anaerobiose**



Fonte : Arquivo Pessoal / Karina Azevedo

### **13. Considerações Finais**

Devido a estreita relação entre qualidade de alimentos e saúde humana, a área de Tecnologia e Inspeção de Alimentos exige que os profissionais atuantes sejam bem qualificados e treinados, especialmente o Médico Veterinário, que deve ter notório saber das patologias que podem acometer os animais de produção bem como a forma de preveni-las, promovendo o bem-estar dos animais e agregando qualidade ao produto final que chega aos consumidores. A metodologia adotada nas análises microbiológicas de alimentos deve seguir os parâmetros de tempo de análise, custo, métodos oficiais, precisão, disponibilidade de reagente, meios de cultura e disponibilidade de espaço no laboratório. Para que seja garantida a aplicação das boas práticas laboratoriais é importante que cada laboratório desenvolva programas de controle de qualidade impedindo, assim, que ocorram contaminações cruzadas entre amostras, ambiente e analistas.

O período de estágio curricular supervisionado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade de Brasília possibilitou um maior conhecimento acerca da importância das análises microbiológicas como controle e fiscalização de qualidade dos alimentos que são consumidos pela população, além de aperfeiçoar as técnicas laboratoriais e ter conhecimento da aplicabilidade prática das legislações que regem esses procedimentos.

## 14. Referências Bibliográficas

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 jan.2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução Normativa nº62, de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 set. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. Glossário de Doenças – Doença Transmitida por Alimentos – Descrição da Doença. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/PDF/2014/setembro/22/Manual-VE-DTA.PDF>. Acesso em set, 2014.

COSTA, Ediná Alves. **Vigilância sanitária: proteção e defesa da saúde**. 2ªed. Ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Vigilância de Medicamentos, 2004. 494p

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002, 424p

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. Ed. Atheneu. 182 p. São Paulo, 2007.

HOBBS, BETTY C; ROBERTS, DIANE. **Toxinfecções e controle higiênico-sanitário de alimentos**. 6ª ed. Varela. São Paulo, 1999. 376p

MADIGAN, MICHAEL T.,; MARTINKO, JOHN.,; PARKER, JACK,. **Microbiologia de Brock**. 10ª ed. São Paulo: Prentice Hall Brasil, 2010. Xiv, 608p. +1 CD-ROM

RODRIGUES, ACÁCIO. Aspectos gerais das infecções por bactérias anaeróbias. Diagnóstico laboratorial das infecções por bactérias anaeróbias, 7 de novembro de 2006. Notas de aula. Mimeografado. 14p

SILVA, Neusely da. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4ªed. Varela. São Paulo, 2010. 624p

Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN net). **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Coordenação Geral de Vigilância das Doenças Transmissíveis**. Brasília, 2014. Disponível em:<[http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3\\_PAINEL\\_1\\_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto\\_2014\\_PDF.pdf](http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf)>. Acesso em 10 de Setembro de 2014.